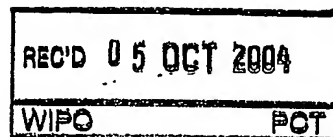


PCT/EP200 4 / 05 17 58



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2003 A 000395 del 12.08.2003**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

73 SET. 2004

Roma li.....

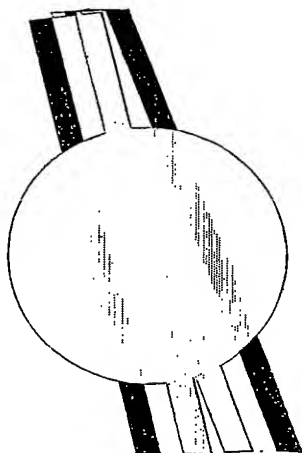
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

IL FUNZIONARIO

[Signature]

CON IL MARCHIO

BEST AVAILABLE COPY



4402PT1T

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

marca
da
bollo

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE. DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione ISTIT. NAZIONALE PER LE MALATTIE INFETTIVE LAZZARO SPALLANZANI - IRCCS N.G. EDResidenza Via Portuense, 292 - ROMA codice 05980991002

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Ing. Cinquantini Bruno ed Altri cod. fiscaledenominazione studio di appartenenza NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.via Savoia n. 82 città ROMA cap 00198 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

C.S.

via

n.

città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (sz/cl/sc)

gruppo/sottogruppo

Terreno di coltura per il mantenimento, la proliferazione e il differenziamento di cellule di mammifero.ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) BORDONI Veronica3) TRIPODI Marco2) ALONZI Tonino

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R1) nessuna

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)

1PROV

n. pag

143

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2)

1PROV

n. tav

19

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3)

1RIS

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

Doc. 4)

1RIS

designazione inventore

Doc. 5)

0RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6)

0RIS

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7)

0

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire

Euro Centottantotto/51

obbligatorio

COMPILATO IL 11/08/2003

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

Ing. Bruno Cinquantini della

CONTINUA SI/NO

NONOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

CAMERA DI COMMERCIO L.A.A. DI

FM 2003 A 000395 ROMAcodice 58

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

Reg.A

L'anno millesimo

Due milatreil giorno dodicidel mese di agostoIl(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 100 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Piero DolaberaL'UFFICIALE ROGANTE
Antonio S.

4402PTIT

PROSPETTO A

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

RM 2003 A 000 395

REG. A

DATA DI DEPOSITO

11/08/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

D. TITOLO

Terreno di coltura per il mantenimento; la proliferazione e il differenziamento di cellule di mammifero.

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

L'invenzione è relativa alla preparazione di un terreno condizionato da utilizzare in colture cellulari di mantenimento, e/o differenziamento di cellule di mammifero, in particolare l'uomo. Il terreno secondo la presente invenzione è condizionato dall'attività secretoria di cellule murine geneticamente modificate ed, in particolare, da epatociti transgenici immortalizzati e differenziati denominati MMH.



M. DISEGNO

PM 2003 A 000 395

* * * * *

gati nel condizionare il mantenimento, la proliferazione e il differenziamento di cellule di mammifero in sistemi di coltura in vitro.

Arte nota

Le cellule MMH sono note e descritte nelle loro caratteristiche fenotipiche e funzionali in varie pubblicazioni (Amicone L. et al EMBO J. 1997; 16:495-503. Spagnoli FM. et al. J Cell Biol. 1998;143:1101-1112. Bellovino D. et al. J Cell Physiol. 1999; 181:24-32. Spagnoli FM. et al. J Cell Sci. 2000; 113:3639-3647. Napolitano M. et al. Free Radic Biol Med. 2001; 30:506-515. Paschetto V. et al. J Virol. 2002; 76:5646-5653.).

La comprensione dei meccanismi molecolari di sopravvivenza e di differenziamento di cellule di mammifero è parte centrale dello studio e dello sviluppo di nuovi protocolli terapeutici finalizzati alla cura di patologie umane che si basano su protocolli di terapia genica e cellulare.

Generalmente i protocolli per la coltivazione di cellule in vitro si avvalgono di terreni di coltura in cui sono aggiunti fattori di crescita e citochine di cui siano noti gli effetti biologici. In alternativa ed in particolare per le colture di precursori d'origine emopoietica, sono utilizzate linee cellulari stromali (Kittler EL et al. Blood. 1992; 22:3168-3178. Eaves CJ. et al. Blood. 1991;78:110-117. Krebsbach PH. et al. Crit Rev Oral Biol Med. 1999;10:165-181; Charbord P. et al. Exp Hematol. 2002;30:1202-1210.

Tuttavia i terreni di coltura noti, senza l'aggiunta di specifiche citochine, presentano svantaggi in quanto non sono terreni di coltura atti a specifici utilizzi, quali il mantenimento di cellule staminali e/o il differenziamento verso specifici programmi differenziativi (quali cellule ematopoietiche, epidermiche, muscolari, epatocitarie ecc.) Inoltre, i suddetti terreni han-

no costi elevati in quanto sono costituiti da cocktail ottenuti con dosaggi definiti e specifici di fattori solubili quali ad esempio IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF, SCF, IL-15, IL-11, NGF, eritropoietina etc. che, proprio per la loro specificità, aumentano notevolmente i costi delle procedure.

E' noto da Aiuti A. et al., Hepatology. 28:1645-1654 (1998) che le cellule MMH possono essere utilizzate in co-coltura a diretto contatto con cellule embrionali derivate da fegato di topo al 15 giorno di vita embrionale. Viene evidenziato che le cellule MMH sono in grado di sostenere il mantenimento, la proliferazione e il differenziamento di cellule ematopoietiche embrionali soprattutto grazie ad un diretto contatto fra lo strato degli epatociti e le cellule ematopoietiche, tale diretto contatto costituisce quindi una condizione specifica di coltura. Tuttavia questo tipo di co-coltura crea dei problemi per l'analisi e l'utilizzo delle cellule così generate in quanto comporta uno stadio di separazione dalle cellule MMH. Tale procedimento inoltre è difficile da realizzare, dato che le cellule ematopoietiche aderiscono, in parte, alle cellule MMH. La separazione manuale dei due tipi cellulari risulta estremamente laboriosa, pertanto il numero delle cellule ematopoietiche purificate è inferiore a quello delle cellule realmente coltivate. Infine, in tale lavoro vengono utilizzate cellule di origine embrionale, caratteristica che limita molto l'attuazione del metodo per problemi sia di bioetica che di disponibilità di materiale.

E' quindi del tutto inatteso il risultato secondo cui, conformemente alla presente invenzione, è possibile coltivare cellule, sia differenziate che staminali, senza la necessità di un diretto contatto cellula-cellula. Inoltre,

è inatteso il risultato secondo cui è possibile utilizzare cellule *ex vivo* derivanti da mammiferi adulti e non da embrioni.

Sommario dell'Invenzione

Scopo della presente invenzione è pertanto quello di fornire un terreno condizionato da utilizzare in colture cellulari di mantenimento, e/o differenziamento di cellule di mammifero, in particolare l'uomo. Il terreno secondo la presente invenzione è condizionato dall'attività secretoria di cellule murine geneticamente modificate ed, in particolare, da epatociti transgenici immortalizzati e differenziati denominati MMH.

Altro scopo dell'invenzione è il metodo per ottenere i terreni di coltura secondo l'invenzione.

Ancora altro scopo è l'utilizzo del terreno condizionato in sistemi di coltura cellulare finalizzati al mantenimento, all'espansione e al differenziamento di cellule di mammifero ed in particolare di cellule staminali.

Ulteriori oggetti risulteranno evidenti dalla descrizione dettagliata dell'invenzione.

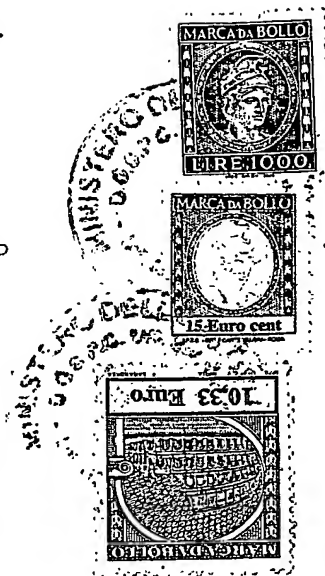
Breve descrizione delle figure

Figura 1: Espansione di cellule ematopoietiche di midollo osseo murino in coltura con il terreno condizionato MMH

Figura 2: generazione di cellule NK (UA52-13+) da cellule staminali ematopoietiche in terreno condizionato MMH

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Secondo la presente invenzione viene fornito un terreno di coltura contenente fattori di crescita, citochine e altri fattori solubili in grado di condizionare la sopravvivenza, la proliferazione ed il differenziamento di



cellule in coltura. La cellula condizionante il terreno è una cellula immortalizzata in linea stabile, geneticamente modificata, caratterizzata dal fatto di essere un epatocita non trasformato.

Secondo una forma preferita dell'invenzione, tale cellula condizionante appartiene alle linee murine MMH, cellule epatocitarie epiteliali differenziate e polarizzate che sono immortalizzate ma non trasformate. Il metodo di produzione e le caratteristiche di tali cellule sono illustrati in lavori pubblicati come già riportato nell'arte nota e che non vengono pertanto qui ulteriormente descritti.

Le cellule di mammifero o le cellule staminali adulte da trattare secondo la presente invenzione sono sottoposte a procedure di crescita e selezione specifiche come appresso descritto.

Secondo una forma preferita dell'invenzione, esse sono coltivate in terreno condizionato da cellule MMH per un periodo di almeno due settimane.

Il terreno condizionato da cellule MMH viene così preparato

- (i) Partendo da cellule congelate in azoto liquido rimesse in coltura in apposito terreno con metodi standard, le linee epatocitarie MMH vengono cresciute in sospensione o adese a matrice extracellulare (per questo si possono utilizzare piastre coperte da uno strato di collagene di tipo I);
- (ii) separare con metodi fisici o staccare dalla piastra le cellule MMH, ad esempio lavando due volte con 1X PBS (Phosphate Buffered Saline) e incubando con 2-5 ml di tripsina/EDTA (Acido Etilen-Diammino-Tetra-Acetico);

(iii) dopo circa 5 min risospendere gli epatociti in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) completo (come descritto da Amicone et al., 1997);

(iv) contare le cellule e piastrarle ad una densità di $1 - 4 \times 10^3 / \text{cm}^2$, in RPMI completo;

(v) mantenere da circa 6 a circa 48 ore;

(vi) allontanare questo primo terreno e sostituirlo con terreno fresco [+FBS (Siero Fetale Bovino) 10% e antibiotici] senza l'aggiunta di fattori di crescita o citochine esogene. Trascorso quindi un periodo di condizionamento compreso tra le 6 e le 48 ore il terreno viene considerato terreno condizionato epatocitario MMH. Le cellule rimangono adese alla piastra per tutto il tempo di produzione del terreno condizionato.

Al momento dell'utilizzo il terreno condizionato MMH viene filtrato per eliminare possibili cellule MMH contaminanti, tipicamente con membrane con pori da $0.2 \mu\text{m}$, e usato direttamente per la coltura delle cellule di mammifero.

Alle linee epatocitarie filtrate può essere aggiunto nuovo terreno fresco (stadio (vi)) che può essere di nuovo usato dopo 6-48 ore come terreno condizionato-MMH. La stessa coltura delle linee epatocitarie MMH può essere mantenuta e riutilizzata per un periodo fino a quattro settimane.

Si può prevedere una liofilizzazione del terreno condizionato che può costituire un elemento di un kit.

E' possibile modificare la composizione del terreno condizionato-MMH tramite sia l'aggiunta che la deplezione di citochine e/o fattori di crescita specifici. Tali modifiche si possono ottenere per aggiunta diretta di citochine e/o fattori di crescita ricombinanti, per deplezione data da anticorpi

neutralizzanti, per frazionamento dei componenti del terreno condizionato-MMH, per manipolazione genetica delle cellule MMH.

Le cellule di mammifero da trattare, per poter essere coltivate in terreno condizionato-MMH, possono richiedere sia la crescita in aderenza (adesione sia su supporto di plastica che su matrice extracellulare) che in sospensione secondo l'arte nota. Inoltre, tali cellule di mammifero derivate sia da embrioni che da adulti, possono essere di origine endodermica, ectodermica e mesodermica con particolare riferimento alle cellule staminali.

Ad oggi, non esistono terreni di coltura e terreni di coltura condizionati da cellule eucariotiche che permettono la crescita *ex vivo* di cellule di mammifero senza l'aggiunta di appropriate citochine o senza il supporto di monostrati di cellule stromali. Inoltre i limiti tecnici che sono riscontrati nella crescita di cellule di mammifero adulte sono principalmente i costi delle procedure, e la manipolazione delle cellule a diretto contatto con cellule stromali.

Quindi i vantaggi dell'utilizzo del terreno condizionato dalle cellule MMH risiedono nel fatto che per la crescita il mantenimento e la proliferazione delle cellule non è necessaria l'aggiunta di citochine esogene. Inoltre l'invenzione facilita la manipolazione delle cellule per indagini successive perché non necessita della presenza di monostrati di supporto per il mantenimento, la proliferazione e il differenziamento di cellule di mammifero. Pertanto le cellule trattate possono essere successivamente processate previa semplice separazione dal terreno di coltura dell'invenzione (ad esempio per centrifugazione). Tale caratteristica

permette di recuperare tutte le cellule realmente prodotte, in quanto utilizzando l'invenzione non si ha la necessità di separare le cellule generate da eventuali cellule di alimentazione, ad esempio, come sopra descritto per le cellule stromali, processo che abbasserebbe notevolmente la resa finale.

L'invenzione verrà ora descritta sulla base di esempi, senza per questo limitarla ad essi, che illustrano l'utilizzo del terreno condizionato-MMH per l'espansione di cellule derivate dal midollo osseo e il differenziamento di cellule staminali adulte, anche con riferimento alle figure.

Esempio 1. *Espansione e differenziamento di cellule ematopoietiche di midollo osseo murino in coltura con il terreno condizionato-MMH*

Le cellule di midollo osseo vengono coltivate in terreno condizionato-MMH per 14 giorni ad una densità tra 20 e $40 \times 10^3/\text{cm}^2$ in una fiasca da 25cm^2 . Ogni due giorni metà del terreno condizionato-MMH è sostituito con terreno fresco. A diversi tempi di coltura, le cellule sono raccolte e contate valutando, quindi, la loro espansione rispetto al numero di cellule presenti all'inizio della coltura.

Nella Figura 1 sono riportati i risultati relativi alla coltura delle cellule ematopoietiche di midollo osseo murino in terreno condizionato-MMH. I risultati ottenuti sono confrontati con la coltura delle stesse cellule in terreno semplice, in terreno condizionato da linee cellulari di epatoma, oppure in co-coltura con il monostrato di cellule MMH in presenza però di una membrana semipermeabile che impedisce il diretto contatto tra i due tipi cellulari ma permette soltanto il passaggio di fattori solubili.

Come mostrato nella figura 1 dopo due settimane le cellule ematopoietiche



che raggiungono un'espansione di rispettivamente 5 ± 1 -volte in coltura con le MMH, e di 6 ± 2 -volte in terreno condizionato-MMH. Viceversa, nelle altre condizioni di coltura di controllo, le cellule ematopoietiche di midollo osseo muoiono rapidamente.

Allo scopo di caratterizzare la popolazione cellulare che è andata incontro ad espansione, è stato analizzato il fenotipo delle cellule risultanti dalla coltura in terreno condizionato-MMH mediante analisi al FACS.

La Tabella 1 confronta la percentuale delle cellule positive a marcatori espressi preferenzialmente sulle cellule T (CD3), B (B220), NK (NK1.1) dendritiche (CD11c), mieloidi (Mac-1), macrofagiche (F4/80) e eritrocitarie (Ter-119) presenti al momento dell'isolamento (giorno 0 della coltura) con quella delle cellule dopo trattamento per 14 giorni con il terreno condizionato-MMH. Come mostrato nella tabella durante questo tempo la maggior parte delle cellule risulta positivo a marcatori associati ad un fenotipo NK (75 ± 12), inoltre è presente una discreta percentuale di cellule dendritiche (13 ± 5).

Tabella 1: caratterizzazione fenotipica delle cellule di midollo osseo murino in terreno condizionato MMH

Popolazione cellulare (fenotipo)	t=0 (%)	t=14 in MMH-CM (%)
Leucociti (CD45+)	≥ 85	95 ± 3
Cellule T (CD3+)	5 ± 1	< 1
Cellule B (B220+)	19 ± 8	< 1
Macrofagi (F4/80+)	Nd	< 1
Eritrociti (Ter-119+)	12 ± 1	< 1
Cellule Mieloidi (Mac-1+)	53 ± 6	95 ± 3
Cellule Dendritiche (CD11c+)	1 ± 0.5	13 ± 5

Natural killer (NK1.1+)	4±2	75±12
MHCII+	1	95±3

Esempio 2. *Differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche in coltura con il terreno condizionato-MMH*

Le cellule staminali ematopoietiche (Sca-1+Lin- e "Side Population") vengono piastrate ad una densità tra 3 e $18 \times 10^3/\text{cm}^2$ in una piastra da 24 pozzetti e coltivate per 14 giorni in il terreno condizionato-MMH come descritto nell'esempio 1.

La Figura 2 mostra l'analisi al FACS della coltura di cellule staminali dopo due settimane di coltura in terreno condizionato-MMH. L'analisi è stata condotta per rilevare la percentuale di cellule differenziate con un fenotipo NK ottenute dalle cellule staminali. L'anticorpo utilizzato (clone UA52-13) riconosce specificatamente cellule NK. Come mostrato nella figura il terreno condizionato-MMH induce il differenziamento verso cellule NK con oltre il 70% delle cellule derivate dalla Side Population o il 57% di quelle derivate dalle Sca-1+Lin-, positive a marcatori associati ad un fenotipo NK.

RIVENDICAZIONI

1. Terreno di coltura condizionato da citochine e fattori solubili rilasciati da cellule immortalizzate in linea stabile, geneticamente modificate, caratterizzate dal fatto di essere epatociti non trasformati, atto al mantenimento, alla proliferazione e al differenziamento di cellule di mammifero, compreso l'uomo. Detto terreno è idoneo alla coltivazione di cellule sia in sospensione che in aderenza su supporti di plastica o matrici extracellulari.
2. Terreno di coltura secondo la riv. 1 caratterizzato dal fatto le cellule condizionanti appartengono alle linee murine MMH, cellule epatocitarie epiteliali differenziate e polarizzate che sono immortalizzate ma non trasformate.
3. Terreno di coltura secondo la riv. 1 caratterizzato dal fatto di essere, modificato nella sua composizione sia mediante aggiunta che mediante deplezione di citochine e fattori solubili atti al mantenimento, alla proliferazione e al differenziamento di cellule di mammifero.
4. Procedimento per la produzione di un terreno di coltura secondo le riv. 1-3 comprendente gli stadi seguenti:
 - (i) far crescere le linee epatocitarie adese su supporto di plastica o su matrice extracellulare o in sospensione;
 - (ii) staccare dalla piastra le cellule o separarle con metodi fisici;
 - (iii) risospendere dopo circa 5 min gli epatociti in RPMI completo;
 - (iv) contare le cellule e piastrarle ad una densità di da 1 a $4 \times 10^3/\text{cm}^2$, in RPMI completo;

- (v) mantenere da circa 6 a circa 48 ore;
- (vi) allontanare questo primo terreno e sostituirlo con terreno fresco senza l'aggiunta di fattori di crescita o citochine esogene.
5. Procedimento secondo la riv. 4 in cui lo stadio (vi) è ripetuto almeno una volta.
6. Procedimento secondo la riv. 4 in cui al momento dell'utilizzo il terreno condizionato viene filtrato (per separare le cellule epatocitarie, tipicamente con membrane con pori da $0.2\mu\text{m}$), e usato direttamente per la coltura delle cellule di mammifero.
7. Uso del terreno di coltura secondo le riv. 1-3 per il mantenimento, la proliferazione e il differenziamento di cellule di mammifero, compreso l'uomo.
8. Uso secondo la riv. 7 in cui le cellule di mammifero sono cellule di mammifero adulto.
9. Uso secondo la riv. 8 in cui le cellule di mammifero sono di origine endodermica, ectodermica e mesodermica, particolarmente cellule staminali adulte.

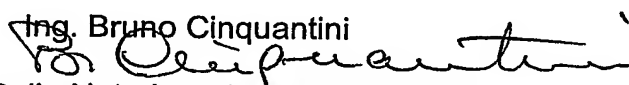
/PV

Roma, 11 Agosto 2003

Per l'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive

"Lazzaro Spallanzani" I.R.C.C.S.

Il Mandatario

Ing. Bruno Cinquantini

Della Notarbartolo & Gervasi SpA



RM 2003 A 000395

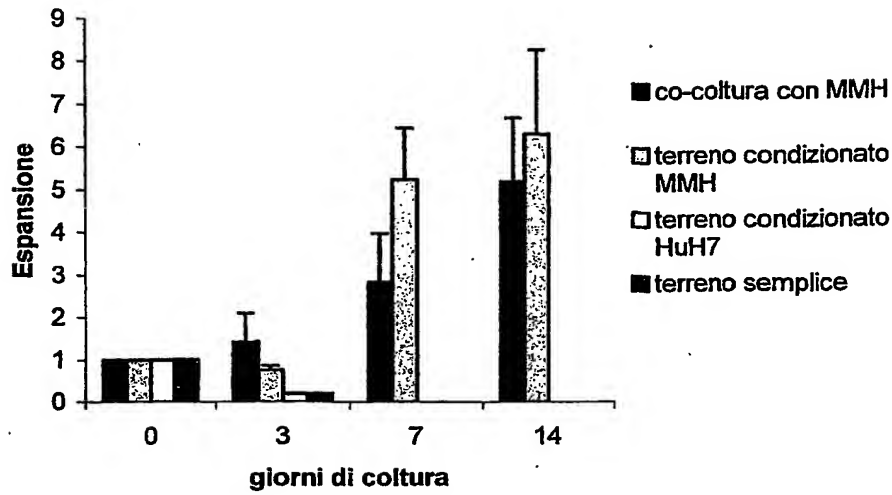


Fig. 1

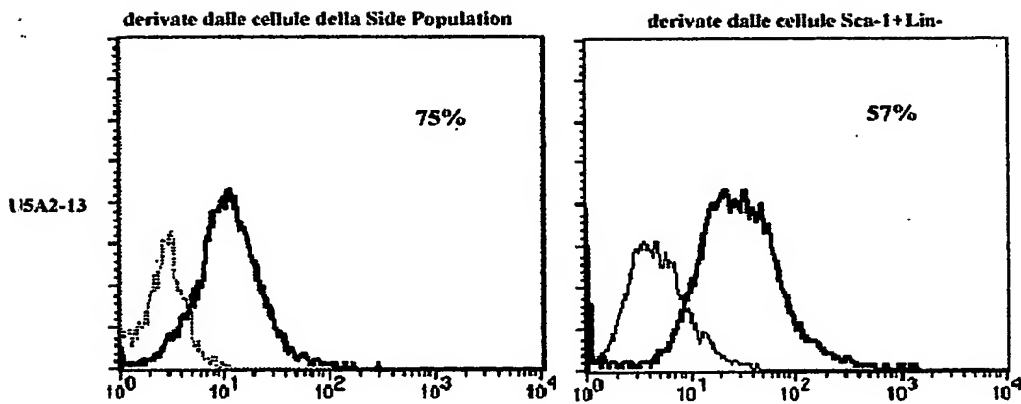


Fig. 2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.